

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Hrvoje Galić

**Utjecaj perinatalne promjene metabolizma  
serotonina na razvoj somatosenzoričke kore  
u štakora**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neurofiziologiju i ponašanje životinja na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za imunohistokemiju i *in situ* hibridizaciju na Odsjeku za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvalio bih prof.dr.sc. Dubravki Hranilović i dr.sc. Sofiji Ani Blažević na stručnosti, kompetentnosti, pomoći i strpljenju pri izradi ovoga diplomskoga rada te na poticanju kritičkoga mišljenja i znanstvenoga načina izražavanja. Posebno bih zahvalio prof.dr.sc. Nataši Jovanov-Milošević što mi je omogućila da veliki dio eksperimenta provedem u Laboratoriju za imunohistokemiju i *in situ* hibridizaciju na HIIM-u te na njenim stručnim savjetima, pomoći i pristupačnosti.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj perinatalne promjene metabolizma serotonina na razvoj somatosenzoričke kore u štakora

Hrvoje Galić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin je biološki aktivan amin prisutan u mozgu i perifernim tkivima sisavaca. Izvršava razne funkcije ovisno o odjeljku u kojemu djeluje. Za vrijeme embrionalnog razvoja, serotonin dovodi do formiranja visokoorganiziranih struktura u somatosenzoričkoj kori štakora, tzv. bačvastih polja. Cilj ovoga diplomskoga rada bio je ispitati utjecaj povišene koncentracije serotonina u doba perinatalnog razvoja na formiranje i strukturu bačvastih polja. Koristili smo mozgove izdvojene iz štakora tretiranih 5-hidroksitriptofanom (5HTP, prekursor serotonina), štakora tretiranih tranilciprominom (TCP, inhibitor ragrađnje serotonina) i štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 22. dana poslije okota. Napravili smo prereze somatosenzoričke kore koje smo obojali po Nisslu. Bačvasta polja smo pronašli pod mikroskopom, skenirali i fotografirali. Nakon kvalitativne analize mikroskopom, pomoću programa ImageJ ocrnali smo bačve u dijelu somatosenzoričke kore zaduženom za primanje podražaja iz brkova štakora te izmjerili površinu, opseg i Feretov promjer bačvi. Usporedbom geometrijskih parametara, ustanovili smo da je izloženost mozga povišenim koncentracijama serotonina tijekom razvoja narušila obrazac formiranja i citoarhitekturu bačvi u somatosenzoričkoj kori štakora. Pri tome su tretmani 5HTP-om i TCP-om pokazali različite utjecaje na formiranje bačvi. Tretman 5HTP-om rezultirao je manjom površinom bačvi, dok je tretman TCP-om narušio strukturu bačvi, u usporedbi s kontrolnom skupinom.

(30 stranica, 8 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: bačve, somatosenzorička kora, 5-hidroksitriptofan, tranilcipromin

Voditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.; dr.sc. Gordana Lacković-Venturinm red. prof.; dr.sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18.2.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### Effect of perinatal change of serotonin metabolism on the development of the somatosensory cortex in rats

Hrvoje Galić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin is a biologically active amine present in the brain and the peripheral tissue of mammals. Serotonin has a variety of functions depending on the compartment in which it is active. During development, serotonin activity results in the formation of highly organized structures in the somatosensory cortex of rats, called barrel fields. The aim of this graduation thesis was to examine the effect of high serotonin levels during perinatal development on the formation and structure of barrel fields. We used rat brains isolated from 3 different experimental groups of rats, each group corresponding to 3 different treatments: 5-hydroxytryptophan (5HTP, serotonin precursor), tranylcypromine (TCP, serotonin degradation inhibitor) and saline (control group). We made sections of the somatosensory cortex which we stained using the Nissl staining method. Having found barrel fields under the microscope, we scanned and photographed them. After we completed the qualitative analysis, we used the software ImageJ to draw barrels which belong to the part of the somatosensory cortex that receives input from the rat's whiskers. We measured the area, perimeter and Feret's diameter. After comparing the mentioned geometric parameters, we concluded that elevated serotonin levels disrupt the pattern of barrel formation and their cytoarchitecture in the somatosensory cortex of rats. When compared with the control group, the 5HTP treatment resulted in barrels having smaller areas while the TCP treatment disrupted their structure.

(30 pages, 8 figures, 4 tables, 32 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: barrels, somatosensory cortex, 5-hydroxytryptophan, tranylcypromine

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.; Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.; Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18.2.2015.

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. SEROTONIN .....	1
1.1.1. STRUKTURA I METABOLIZAM .....	1
1.1.2. SMJEŠTAJ I FUNKCIJA U PERIFERNIM TKIVIMA.....	2
1.1.3. SMJEŠTAJ I FUNKCIJA U CENTRALNOM ŽIVČANOM SUSTAVU (CNS-u) .....	2
1.1.4. ODNOS IZMEĐU SREDIŠNJEG I PERIFERNOG ODJELJKA .....	6
1.1.5. SEROTONINSKA HOMEOSTAZA .....	7
1.2. POREMEĆAJ SEROTONINSKE HOMEOSTAZE .....	7
1.2.1. KLINIČKA ISTRAŽIVANJA .....	7
1.2.2. ISTRAŽIVANJA NA ANIMALNIM MODELIMA .....	9
1.2.3. MODEL PERINATALNO POREMEĆENOG METABOLIZMA SEROTONINA .....	10
2. CILJ .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	11
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. UZORCI .....	12
3.1.2. KEMIČALIJE .....	12
3.1.3. PRIBOR I POMAGALA.....	12
3.2. METODE .....	13
3.2.1. IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA .....	13
3.2.2. ANALIZA I SLIKANJE PREPARATA .....	15
3.2.3. OBRADA I ANALIZA SLIKA .....	15
3.2.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	16
4. REZULTATI.....	12
4.1. ANALIZA HISTOLOŠKIH PREPARATA.....	17
4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA BAČVI U BAČVASTOM POLJU .....	18
4.2.1. POVRŠINA.....	18
4.2.2. OPSEG .....	19
4.2.3. FERETOV PROMJER .....	20
5.RASPRAVA.....	24
5.1. UČINAK 5HTP-a.....	24
5.2. UČINAK TCP-a.....	25
6. ZAKLJUČCI.....	26
7.LITERATURA.....	23

# POPIS KRATICA

<b>5HIAA</b>	5-hidroksi-3-indoloctena kiselina
<b>5HT</b>	5-hidroksitriptamin
<b>5HTP</b>	5-hidroksitriptofan
<b>CNS</b>	centralni živčani sustav
<b>MAO</b>	monoaminooksidaza
<b>MAOA</b>	monoaminooksidaza A
<b>MAOB</b>	monoaminooksidaza B
<b>PND</b>	postnatalni dan
<b>TCA</b>	talamokortikalni aksoni
<b>TCP</b>	tranilcipromin
<b>TPH</b>	triptofan-hidroksilaza
<b>TPH1</b>	triptofan-hidroksilaza 1
<b>TPH2</b>	triptofan-hidroksilaza 2
<b>VMAT2</b>	vezikularni monoaminski transporter 2

# **1. UVOD**

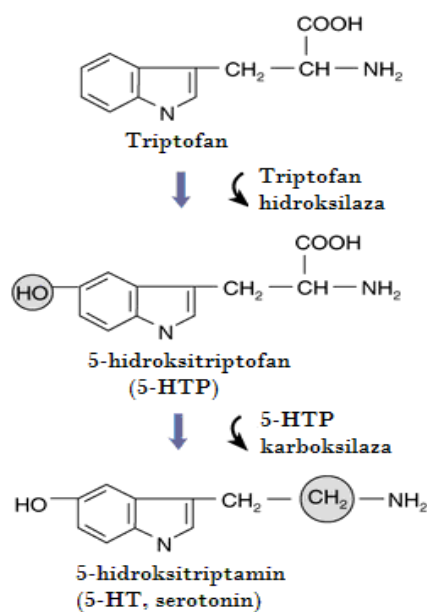


## 1.1. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan indolamin prisutan u mozgu i perifernim tkivima sisavaca. Pripada porodici monoaminskih neurotransmitera u kojoj su još histamin te katekolaminski neurotransmiteri (adrenalin, noradrenalin i dopamin). U prirodi je široko rasprostranjen: od plodova raznih biljaka do glavonožaca. U mozgu regulira razvoj serotonergičnih neurona i ciljnih tkiva tijekom neurogeneze, a kasnije ima ulogu neurotransmitera koji posreduje u mnogim neurofiziološkim procesima (Lucki, 1998). Neke od važnih neurofizioloških funkcija koje serotonin kontrolira uključuju raspoloženje, hranjenje, spavanje, spolnu aktivnost, cirkadijane ritmove (fiziološki ciklusi od 24 h) te kognitivnu fleksibilnost (Murphy i sur., 1998).

### 1.1.1. STRUKTURA I METABOLIZAM

Serotonin se sintetizira pomoću dvije relativno jednostavne biokemijske reakcije iz prekursora (esencijalne aminokiseline triptofan) preko međuprodukta 5-hidroksitriptofana (5HTP). Ograničavajući korak u sintezi je reakcija hidroksilacije koju katalizira enzim triptofan hidroksilaza (TPH) (Slika 1) (Walther i sur., 2003).



**Slika 1.** Shematski prikaz reakcija sinteze serotonina  
(preuzeto iz Hranilović i Blažević, 2013).

Razgradnja serotonina uključuje oksidativnu deaminaciju kataliziranu enzimom monoamin oksidaza (MAO) koji se nalazi na vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Billet, 2004). Enzim MAO također sudjeluje i u metabolizmu katekolamina dopamina i noradrenalina (Davies i sur., 1996). Glavni produkt razgradnje serotonina je 5-hidroksi-3-indolactena kiselina (5HIAA) koja se izlučuje urinom (Hranilović i Blažević, 2013).

### 1.1.2. SMJEŠTAJ I FUNKCIJA U PERIFERNIM TKIVIMA

Metabolizam serotonina u oba odjeljka (središnjem i perifernom) je isti, međutim, razlikuju se neki enzimi koji sudjeluju u njegovom metabolizmu te funkcije koje serotonin izvršava u pojedinom odjeljku. U perifernim tkivima sintetizira se oko 90% ukupnog serotonina. 5HT koordinira i kontrolira određene aspekte gastrointestinalnog, kardiovaskularnog, mišićnog, dišnog, osjetilnog i reproduktivnog sustava te sudjeluje u procesu aktivacije trombocita. Periferni 5HT se sintetizira u enterokromafinim stanicama crijeвне mukoze gdje se ujedno i pohranjuje u sekrecijskim granulama te se, u točno određenim okolnostima, oslobađa u portalnu cirkulaciju (Racke i sur., 1995).

U gastrointestinalnom sustavu 5HT potiče kontrakciju glatkih mišića te pospješuje crijeвnu peristaltiku djelujući pritom kao lokalni neurotransmiter i hormon. Metabolizira se do 5HIAA prvenstveno u endotelnim stanicama pluća i jetre (Hranilović i Blažević, 2013).

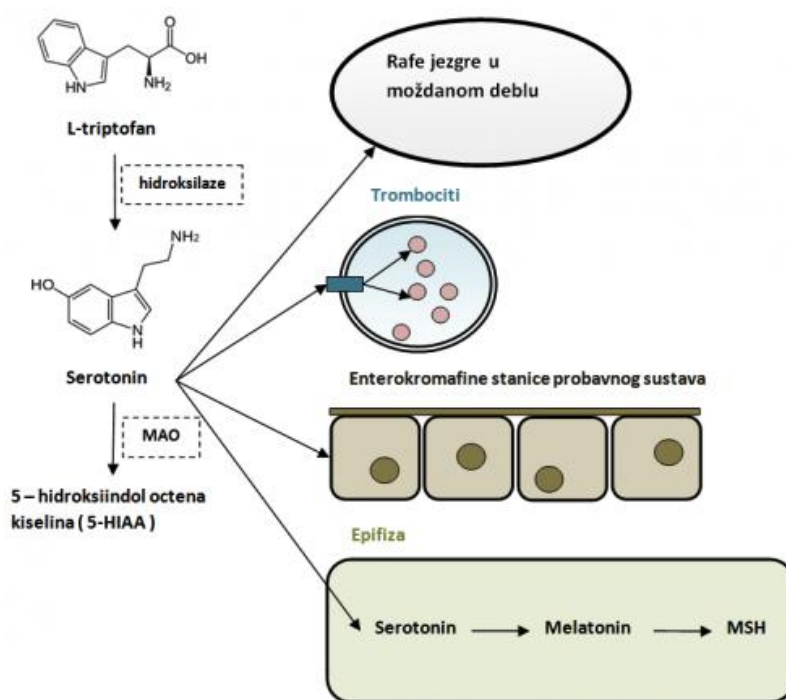
Više od 99% serotonina u krvi je uskladišteno u trombocitima. 5HT se aktivno transportira u trombocite preko 5HT transportera koji se nalazi na membrani trombocita. Proces transporta događa se tijekom cijelog života trombocita koji traje oko 8 do 10 dana. Pri zgrušavanju krvi, trombociti se vežu na niti fibrina te oslobađaju 5HT koji djeluje kao vazokonstriktor, a ujedno i pospješuje agregaciju trombocita čime pridonosi procesu hemostaze. Iako je enzim MAO prisutan u trombocitima, većina 5HT iz trombocita se razgrađuje u jetri i plućima (Stolz, 1985). U kardiovaskularnom sustavu ima ulogu i u regulaciji srčanog ritma i krvnog tlaka (Berger i sur., 2009).

Na dišni sustav, serotonin može djelovati izravno preko centra za regulaciju disanja u moždanom deblu te neizravno putem vazodilatacije i vazokonstrikcije krvnih žila. Serotonin utječe i na kontrakcije skeletnih mišića. U epifizi se serotonin kemijski transformira u melatonin koji sudjeluje u regulaciji cirkadijanih ritmova. Nadalje, u reproduktivnom sustavu serotonin može djelovati na izlučivanje testosterona, inhibiciju ejakulacije, kontrakciju epididimisa te inhibiciju mokrenja kod muškaraca. Kod žena djeluje na razvoj mliječnih

žlijezda, vazokonstrikciju, kontrakciju glatkih mišića maternice te sazrijevanje jajnih stanica i izlučivanje progesterona (Berger i sur., 2009).

### 1.1.3. SMJEŠTAJ I FUNKCIJA U CENTRALNOM ŽIVČANOM SUSTAVU (CNS-u)

Tijela neurona koji sintetiziraju 5HT skupljena su u regijama mozga koje se nazivaju jezgre rafe (*nuclei raphe*) u ponsu i moždanom deblu (Slika 2). Neuroni jezgara rafe pružaju svoje aksone u više različitih kortikalnih i subkortikalnih regija mozga. Jednom kada serotoninски završeci stignu u ciljno područje, serotonin djeluje na razvoj ciljnih tkiva. Tijekom razvoja mozga, 5HT djeluje kao neurorazvojni signal koji regulira rast vlastitih neurona i sazrijevanje ciljnih regija. U odrasloj dobi, serotonin modulira funkciju i plastičnost odraslog mozga djelujući kao neurotransmiter u serotonergičnoj sinapsi (Whitaker-Azmitia, 2001).



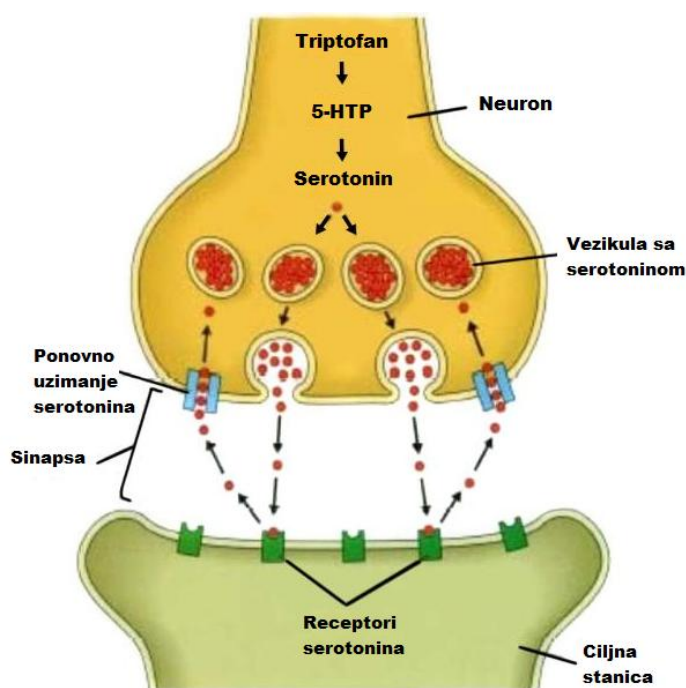
**Slika 2.** Prikaz sinteze, razgradnje i smještaja 5HT u CNS-u i perifernim tkivima (preuzeto iz [http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab\\_wiki/\\_/farmakologi/serotonin-i-ergot-alkaloidi-r280](http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/_/farmakologi/serotonin-i-ergot-alkaloidi-r280)).

Nakon sinteze iz prekursora, neuronski 5HT se aktivno prenosi u sinaptičke vezikule uz pomoć vezikularnog monoaminskog prijenosnika (VMAT) te se pohranjuje u aksonske završetke. U trenutku kad akcijski potencijal u presinaptičkom neuronu doputuje do

aksonskog završetka, otvaraju se naponom regulirani kalcijevi kanali, kalcij ulazi u neuron te potiče egzocitozu 5HT u sinaptičku pukotinu. Oslobođeni 5HT difundira preko sinaptičke pukotine i veže se na 5HT receptore koji se nalaze na membrani postsinaptičkog neurona (Slika 3) (Berger i sur., 2009).

Receptori 5HT pripadaju obitelji receptora povezanih s G-proteinima (metabotropni) ili ionskim kanalima reguliranih ligandom (ionotropni). Ukupno postoji sedam razreda serotoninских receptora, neki od njih su: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2, i 5-HT3 (Kitson, 2007). Također, određeni receptori 5HT, koji se nazivaju autoreceptori, nalaze se na presinaptičkim neuronima i reguliraju brzinu sinteze 5HT i oslobađanje iz neurona (mekanizam negativne povratne sprege) (Berger i sur., 2009).

Djelovanje 5HT u sinapsi mora biti vremenski ograničeno da bi se izbjegle neželjene posljedice konstitutivne aktivacije receptora, stoga se serotonin mehanizmom ponovnog unosa transportira u presinaptički neuron preko 5HT transportera (5HTt). Jednom kada 5HT ponovno uđe u presinaptički neuron, 5HT se ili ponovno pakira u vezikule (recikliranje) ili se razgrađuje do metabolita 5HIAA djelovanjem MAO (Berger i sur., 2009).

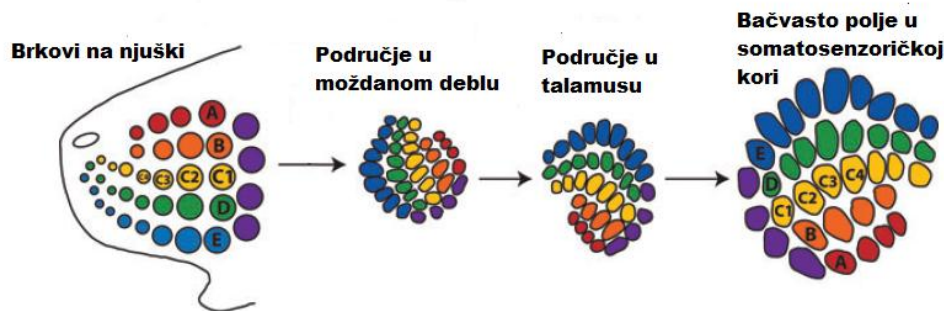


**Slika 3.** Mekanizam djelovanja serotonina kao neurotransmitera  
(preuzeto iz <http://www.completehealthdallas.com/Anti-DepressantsNaturalAlternativeDallas.html>).

Razvoj neurona koji sadržavaju serotonin proučavan je u štakora, kokoši, primata i ljudi. 5HT je mitogeni i morfogeni čimbenik, a ujedno i signal u diferencijaciji korteksa. Kod svih vrsta najveći funkcionalni status serotonina je u ranoj fazi razvoja, a razine u odrasloj dobi su mnogo niže. U ljudskom mozgu, serotonergični neuroni se prvo uočavaju oko petog tjedna gestacije i naglo se povećavaju tijekom desetog tjedna gestacije. Do 15. tjedna gestacije postiže se organizacija tijela serotonergičnih neurona u jezgrama rafe. Razine serotonina povećavaju se polako tijekom prve dvije godine života i padaju nakon pete godine života. Dolazak serotonina u ciljna područja prije katekolamina, može regulirati razvoj ostalih monoaminergičnih neurona u tim područjima. Serotonin regulira sazrijevanje ciljnih područja pa je količina serotonina ključna za pravilan razvoj moždane kore (Whitaker-Azmitia, 2001).

Serotonin utječe na proces neurogeneze, podrezivanje sinapsi, oblikovanje dendrita, remodeliranje, održavanje sinapse i migraciju neurona. Navedeni procesi mogu dovesti do sofisticirane organizacije hipokampusa ili senzoričkih mapa koje se nazivaju bačvasta polja (eng. *barrel fields*) (Whitaker-Azmitia, 2001). Unutar somatosenzoričke kore, životinje s velikim brkovima imaju posebne module ili „bačve“ unutar sloja IV koje sadržavaju neurone koji selektivno odgovaraju na stimulaciju jednog brka na kontralateralnoj strani njuške. U štakora, bačvasta polja se formiraju u prvom postnatalnom tjednu stvaranjem sinapsi između presinaptičkih talamokortikalnih aksona (TCA) i postsinaptičkih dendrita sloja IV somatosenzoričke kore. Bačve čine snopovi živčanih vlakana okruženi gustim granularnim stanicama (neuronima) sloja IV koje čine njihov rub i daju im karakterističnu morfologiju. Prostor između susjednih bačvi čini šupljina (lat. *septum*) bez stanica (Li i Crair, 2011).

Bačvasto polje zaduženo za primanje podražaja iz brkova štakora je organizirano u pet redova naslovljenih slovima od A do E. Svaki red ima različiti broj stupaca, pri čemu jedan stupac odgovara jednoj bačvi. Red A i B imaju četiri stupca, red C ima pet stupaca, a redovi D i E sedam. Navedena prostorna organizacija bačvastih polja odražava organizaciju brkova na njuški (Slika 4) (Miceli, 2013).



**Slika 4.** Shematski prikaz prostorne organizacije bačvastih polja u somatosenzoričkoj kori te analognih regija u moždanom deblu, talamusu i na njuški  
(prilagođeno prema Li i Crair, 2011)

5HT u kori potječe iz aksonskih završetaka jezgara rafa u moždanom deblu. U talamokortikalnoj sinapsi, 5HT se uzima preko TCA pomoću 5HT transportera. 5HT se tada pakira u sinaptičke vezikule preko transportera monoamina, VMAT2. 5HT koji se ne pakira u završecima TCA, degradira se djelovanjem enzima MAO. Ostatak 5HT u talamokortikalnoj sinaptičkoj pukotini može aktivirati G-protein povezan sa serotonininskim receptorom 5HT1B eksprimiranim na TCA. 5HT1B receptor, 5HT transporter i VMAT2 su eksprimirani tijekom prva tri postnatalna tjedna u završecima TCA što ukazuje na njihovu moguću ulogu u razvoju talamokortikalne sinapse (Li i Crair, 2011).

#### 1.1.4. ODNOS IZMEĐU SREDIŠNJEG I PERIFERNOG ODJELJKA

Središnji i periferni odjeljak su odvojeni, ali i povezani dijelovi. Prvo, 5HT se sintetizira i regulira neovisno u svakom odjeljku. Enterokromafine stanice i serotonergični neuroni koriste različite enzime TPH (TPH1 i TPH2) za sintezu 5HT. Nadalje, krvno-moždana barijera sprječava miješanje serotonina iz ta dva odjeljka. Proteini koji reguliraju djelovanje 5HT u oba odjeljka kodirani su istim genima, imaju identičnu primarnu strukturu i slijede istu kinetiku. Tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja, krvno-moždana barijera nije posve formirana te serotonin može slobodno prelaziti između odjeljaka i na taj način periferni serotonin može utjecati na razvoj neuralnog 5HT sustava (Walther i sur., 2003).

### 1.1.5. SEROTONINSKA HOMEOSTAZA

Tijekom razvoja, serotonin mora biti prisutan u različitim regijama mozga u optimalnoj koncentraciji koja je kontrolirana preko razina sinteze i degradacije 5HT (ekspresija sintetskih i razgradnih enzima), kao i preko intenziteta i trajanja sinaptičke aktivnosti 5HT (ekspresije serotoninских receptora i transportera) (Walther i sur., 2003).

Sam serotonin regulira rast neuralnih terminalnih završetaka pozitivno, preko interakcije s faktorima rasta u ciljnim tkivima i negativno, preko interakcije s autoreceptorima 5HT na serotoninіčnim završecima (Whitaker-Azmitia, 2001, Chugani, 1997). Neuronі u kulturi koji se tretiraju povišenom koncentracijom analoga cAMP, mijenjaju morfologiju te fenotipski nalikuju na zrele serotoninіčne neurone. Ta promjena postiže se indukcijom ekspresije triptofan hidroksilaze (ograničavajućeg enzima u nastanku serotoninа) i smanjenjem ekspresije inhibicijskog autoreceptora (Chugani, 1997).

No, serotonin može i inhibirati rast završetaka, preko serotoninских receptora na serotoninіčnim završecima (Whitaker-Azmitia, 2001). Receptori 5HT1A nalaze se na tijelu serotoninіčnih neurona u jezgrama rafe kao i u ciljnim tkivima, pogotovo u limbičkom sustavu. U zrelom mozgu, u jezgrama rafe, receptori 5HT1A su inhibicijski autoreceptori. Slično, tijekom razvoja, receptor 5HT1A u jezgrama rafe ima ulogu u inhibicijskoj autoregulaciji razvoja serotoninских neurona. Autoinhibicijska uloga serotoninа preko receptora 5HT1A ostvaruje se preko inhibicije sekundarnog glasnika (cAMP-a) (Whitaker-Azmitia, 2005).

## 1.2. POREMEĆAJ SEROTONINSKE HOMEOSTAZE

### 1.2.1. KLINIČKA ISTRAŽIVANJA

Poremećena homeostaza 5HT može uzrokovati poremećaje u razvoju organizma ili poremećaje ponašanja. Smatra se da promjena u serotoninској homeostazi predstavlja neurobiološku podlogu nekih bolesti poput autizma, Downovog sindroma, depresije, shizofrenije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, anoreksije, bulimije, bipolarnog poremećaja te alkoholizma (Whitaker-Azmitia, 2001). Autizam je neurorazvojni sindrom kojeg karakteriziraju problemi u socijalnoj interakciji, jeziku i komunikaciji te prisutnost stereotipnih ponašanja i interesa (Whitaker-Azmitia, 2005).

Najčešća poveznica 5HT i autizma je hiperserotoninemija (povišena razina serotonina u krvi). U istraživanjima provedenima u zadnjih nekoliko desetljeća otkrivene su povećane razine 5HT u krvi u jednoj trećini oboljelih od autizma, ali još uvijek nije razjašnjen mehanizam promatranog fenomena i povezanosti s poremećajem serotonina u CNS-u. Jedno od objašnjenja je da dolazi do promjene u ekspresiji jednog ili više serotoninskih elemenata što može dovesti do poremećene regulacije prijenosa 5HT u mozgu (na taj način pogađa se rani razvoj i nastaju promjene u ponašanju karakteristične za autizam), a u periferiji je prisutna hiperserotoninemija. Drugo objašnjenje je da poremećena regulacija homeostaze 5HT u periferiji može uzrokovati povećane koncentracije serotonina u krvi. Postoji mogućnost da visoke razine 5HT inhibiraju razvoj 5HT neurona tijekom fetalnog i postnatalnog razvoja (prije formiranja krvno-moždane barijere) i dovode do anatomskih i fizioloških promjena karakterističnih za autizam (Whitaker-Azmitia, 2005).

Pokazalo se da postoji povezanost između serotonina i razvoja alkoholizma. Pri konzumiranju alkohola dolazi do povećane aktivnosti 5HT<sub>3</sub> receptora što je vjerojatno posljedica ili direktne interakcije alkohola i receptora ili interakcije alkohola i drugih molekula povezanih s receptorom na staničnoj površini. Posljedica povećane aktivacije 5HT<sub>3</sub> receptora je povećano otpuštanje drugih neurotransmitera vezanih uz glavne simptome alkoholne intoksikacije. Kronično konzumiranje alkohola vodi do tolerancije koju obilježavaju znatne adaptivne promjene u mozgu. Primijećeno je da pri kroničnoj konzumaciji alkohola, dolazi do povećane aktivacije 5HT<sub>2</sub> receptora. Nakon prestanka konzumiranja alkohola, javlja se obrazac ponašanja sličan anksioznosti što se pripisuje visokoj koncentraciji 5HT vezanog na 5HT<sub>2</sub> receptor. Blokiranje 5HT<sub>2</sub> antagonistima je pokazalo smanjenje anksioznog ponašanja što potkrepljuje tezu da su 5HT i njegovi receptori povezani s kratkoročnim i dugoročnim efektom konzumiranja alkohola. Pretpostavlja se da se ovisnost o alkoholu (alkoholizam) razvija jer mozak nastoji nadoknaditi snižene razine serotonina. Naime, pronađeno je da je u mozgovima štakora ovisnih o alkoholu izrazito smanjena koncentracija serotonina u području jezgra rafa i centara za nagradu odgovornih za efekt nagrade pri konzumiranju alkohola. Moguće je da mozak razvija ovisnost o alkoholu ne bi li time nadoknadio manjak serotonina budući da i pri akutnom djelovanju, alkohol povećava razinu serotonina i aktivira njegove receptore (McBride, 2004).



Relativno niska koncentracija serotonina je pronađena u cerebrospinalnoj tekućini ljudi oboljelih od shizofrenije. Istraživanja su pokazala postojanje korelacije između niske koncentracije serotonina u mozgu i suicidalnih te agresivnih epizoda u shizofrenim pacijentima što ukazuje da je serotonin potencijalno uključen i u razvoj shizofrenije (Van Praag, 1983).

### 1.2.2. ISTRAŽIVANJA NA ANIMALNIM MODELIMA

Postoji nekoliko animalnih modela razvijenih u svrhu proučavanja poremećaja serotoninske homeostaze. Dva su modela dobivena inaktivacijom gena mutacijom te podupiru činjenicu da u raznim mentalnim, neurološkim i razvojnim poremećajima dolazi do promjene u serotonergičnim elementima u središnjem i perifernom odjeljku. U prvom modelu mutiran je gen za 5HT transporter što rezultira povećanom aktivnošću 5HT transportera i posljedično povećanim unosom 5HT. U mozgu se mijenja aktivacija serotonergičnih neurona jezgara rafe dok se na periferiji javlja hiperserotoninemija (Sutcliffe i sur., 2005).

U drugom modelu inaktiviran je gen za receptor serotonina (5HT1A) koji igra važnu ulogu u razvoju mozga, dok kod odrasle jedinke ima funkciju autoreceptora koji regulira otpuštanje 5HT u sinaptičku pukotinu. *Knockout* miševi za 5HT1A receptor bili su hiperserotoninemični te su pokazivali povećanu anksioznost (Janusonis i sur., 2006).

Model razvojne hiperserotoninemije (DHS, engl. *developmental hyperserotonemia*) je farmakološki model dobiven tretiranjem štakora neselektivnim agonistom 5HT receptora (5-metoksitriptaminom) u razdoblju razvoja serotonergičnih neurona od 12. gestacijskog dana do 20. postnatalnog dana (Shemer i sur., 1991). Štakori su pokazali metaboličke promjene u mozgu istraživane oslikavanjem mozga *in vivo*, dok je u postmortalnim analizama moždanog tkiva uočen gubitak stanica koje sadržavaju oksitocin u paraventrikularnoj jezgri hipotalamusa i povišenu razinu peptida povezanog s kalcitoninskim genom u amigdali. Na razini ponašanja, životinje su pokazale preosjetljivost na zvučni ili taktilni podražaj, dok su promjene u socijalnim i drugim ponašanjima nalikovale onima koje se manifestiraju u autizmu (McNamara i sur., 2008).

### 1.2.3. MODEL PERINATALNO POREMEĆENOG METABOLIZMA SEROTONINA

U Zavodu za animalnu fiziologiju razvijen je model štakora s perinatalno poremećenim metabolizmom serotonina. Štakori perinatalno tretirani prekursorom sinteze 5HT, 5-hidroksitriptofanom (5HTP) ili inhibitorom razgradnje 5HT, tranilciprominom (TCP) imaju promijenjenu serotoninsku homeostazu. Pri tome, 5HTP izaziva hiperserotoninemiju bez značajnih promjena razine serotonina u mozgu, a TCP uz hiperserotoninemiju izaziva i značajan porast razine serotonina u mozgu. Izloženost povišenim koncentracijama 5HT tijekom razvoja mozga rezultirala je dugoročnim promjenama na biokemijskoj razini (snižena razina 5HT), ekspresijskoj razini (pojačana ekspresija gena za MAO) i na razini ponašanja (anksiolitički učinak). Pri tome su navedene promjene slabije izražene u životinja s perinatalno narušenom homeostazom 5HT u perifernom odjeljku (tretman 5HTP-om), a jače u životinja tretiranim s TCP-om koji narušava homeostazu serotonina i u središnjem i u perifernom odjeljku (Hranilović i sur., 2011; Blažević i Hranilović, 2013).

## **2. CILJ**

U ovom diplomskom radu istražili smo utjecaj perinatalno povišene razine 5HT na obrazac formiranja i citoarhitekturu bačvastih polja u somatosenzoričkoj kori mladunaca štakora. U tu smo svrhu načinili histološke preparate mozga štakora neposredno po završetku perinatalnog tretmana prekursorom serotonina, 5-hidroksitriptofanom, inhibitorom razgradnje serotonina, tranilciprominom ili fiziološkom otopinom. Kvalitativnu usporedbu prereza mozga izvršili smo pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja po Nisslu, a kvantitativnu mjerenjem površine, opsega i Feretovog promjera bačvi u bačvastom polju nakon skeniranja preparata.

# **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. UZORCI

U istraživanjima su korišteni mozgovi četiriju štakora tretiranih 5HTP-om, triju štakora tretiranih TCP-om i triju štakora tretiranih fiziološkom otopinom. Mозgovi su izdvojeni 22. dana nakon okota i držani su 14 dana u 4% paraformaldehidu.

#### 3.1.2. KEMIČKE

- Cresyl violet (histokemijska boja)
- deionizirana H<sub>2</sub>O
- etanol (25%, 50%, 70%, 96%, 100%)
- paraformaldehid (4%)
- parafin
- toluen
- ksilen
- agaroza (Oxoid microbiology, Velika Britanija)
- Histomount (National Diagnostics)

#### 3.1.3. PRIBOR I POMAGALA

- mikropipete (BRAND TransferpetteR, Njemačka)
- predmetna stakalca (Super frost, Menzel-Glaser, Njemačka)
- pokrovnice
- kadica za ispiranje
- 15 mL Falcon epruvete (BD Biosciences, SAD)
- vodena kupelj (Mettler GmbH Co. KG, Njemačka)
- mikroskop (Olympus Provis AX70, Japan)
- vibratom 1500 (Vibratome, SAD)
- fotoaparati (Nikon DXM1200, Japan)
- skener (Hp Scanjet 3570c, SAD)
- skalpel
- hladnjak (+4 °C)
- zamrzivač (-20 °C)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA

Na samom početku postupka pripreme prikladnih histoloških preparata mozgova je postupak parafinizacije, u svrhu održavanja strukture moždanog tkiva (Tablica 1).

**Tablica 1.** Sumarni prikaz koraka pri uklapanju uzoraka u parafin i odgovarajućeg vremena potrebnog za svaki korak

korak pri uklapanju u parafin	vrijeme
<b>1. FIKSACIJA</b> (4%-tna otopina paraformaldehida, puferirani)	5-7 dana na +4°C
<b>2. ISPIRANJE u dH<sub>2</sub>O</b> (demineralizirana)	24 h
<b>3. DEHIDRACIJA</b> 25 % alkohol 50 % alkohol 70 % alkohol 96 % alkohol 100 % alkohol	2x30 min 2x30 min 2x30 min 2x30 min 2x30 min
<b>4. TOLUEN I PARAFIN</b> (u omjeru 50:50)	15-20 min (maksimalno 30 min)
<b>5. PARAFIN</b>	3 promjene, sve ukupno unutar 3-6 h

Parafinizaciju smo započeli dvotjednom fiksacijom uzoraka u 4%-tnoj otopini paraformaldehida. Nakon toga, uzorke smo stavili u kadice napunjene demineraliziranom vodom i ostavili ih 24 h. Napunili smo pet kadica etanolom te smo stavljali uzorke u kadice redom od najniže do najviše koncentracije etanola (počevši od 25%-tnog etanola, zatim 50%-tnog, 70%-tnog, 96%-tnog i naposljetku 100%-tnog etanola). Uzorci su u pojedinoj koncentraciji etanola bili dva puta po 30 min (ukupno 1 h). Svaki pol sata, izlili smo etanol u kojemu je uzorak te ponovno dodali istu koncentraciju etanola u kadicu. Po završetku

ispiranja u demineraliziranoj vodi i etanolu, uzorke smo stavili u toluen i parafin (u omjeru 50:50), zatim u 100%-tni parafin u kojemu smo ih držali 3-6 h (uz tri promjene izlivanja-uljevanja parafina unutar toga vremenskoga perioda). Uzorci uklopljeni u parafin mogu stajati duže vrijeme, do prikupljanja preostalih uzoraka i parafinizacije istih. Nakon prikupljanja i uklapanja svih uzoraka, uslijedio je postupak deparafinizacije. Postupak deparafinizacije smo započeli stavljanjem uzoraka u kadice s etanolom redom od najviše do najniže koncentracije etanola (počevši od 100%-tnog etanola, zatim 96%-tnog, 70%-tnog, 50%-tnog i naposljetku 25%-tnog etanola). Uzorci su u pojedinoj koncentraciji etanola bili 3 min. Po završetku ispiranja u etanolu, uzorke smo stavili u ksilen (dva puta po 3 min). Izolirali smo somatosenzoričku koru tako da smo ogulili parijetalni režanj i pomoću skalpela napravili rez od 5x10 mm te ga potom uklopili u 4%-tni agarozni gel. U takvom obliku uzorci su bili spremni za rezanje. Uzorke smo rezali pomoću vibratoma sve dok je bilo tkiva. Debljina rezova je bila u rasponu između 50 i 70  $\mu$ m, a prosječan broj rezova po uzorku je bio 16. Nakon rezanja, uzorke smo lijepili na stakalca, posebno dizajnirana za prihvaćanje histoloških preparata zbog površinskog sloja silicija i bez ikakvih dodatnih ljepila. Po stakalcu je bilo 4 do 10 rezova, ovisno o veličini rezova. Prerezi na stakalcima sušili su se na zraku 24h. Idući dan, uzorke smo stavili 10 min u kadicu ispunjenu bojom Cresyl violet (bojanje po Nisslu). Boja Cresyl violet je histokemijska boja koja tamno ljubičasto boji tijela neurona, odnosno, hrapavi endoplazmatski retikulum što omogućava vizualizaciju svjetlosnim mikroskopom. Nakon bojanja, započeli smo odbojavanje (ispiranje) kako bi dobili najbolju razlučivost tkiva otklanjanjem suviška boje. Ispirali smo u kadicama s deioniziranom vodom, 75%-tnim etanolom i 95%-tnim etanolom. Ovisno o intenzitetu boje Cresyl violet (svjetlije-tamnije), vrijeme ispiranja je variralo između 1 i 5 min. Nakon toga, ispirali smo dva puta po 3 min u 100%-tnom etanolu. Konačno ispiranje napravili smo uranjanjem preparata u kadicu s ksilenom (dva puta po 3 min). U navedenim koracima parafinizacije, deparafinizacije, bojanja i odbojavanja, koristili smo volumene tekućina i otopina koji su bili dovoljni da uzorci mogu biti u potpunosti uronjeni u njima. Za trajno spremanje preparata, pokrili smo preparat posebnim sredstvom Histomount i poklopili pokrovnicom. Preparati su se osušili na sobnoj temperaturi preko noći.



### 3.2.2. ANALIZA I SLIKANJE PREPARATA

Preparate smo sustavno pregledavali pod svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 4x dok nismo identificirali područje bačvastih polja. Najbolje preparate smo fotografirali fotoaparatom priključenim na mikroskop, koristeći pritom povećanje 2x. Nakon toga, svaki preparat smo skenirali u svrhu dobivanja digitalnih slika preparata koje se mogu kvantitativno analizirati. Po preparatu je bilo više moždanih presjeka.

### 3.2.3. OBRADA I ANALIZA SLIKA

Nakon dobivanja digitalnog oblika preparata, uslijedila je obrada i analiza slika pomoću programa Microsoft Office Picture Manager, Paint i ImageJ. Na početku pomoću programa Microsoft Office Picture Manager svaka slika preparata se zumira (50%-70%) da bi se uhvatio pojedinačni presjek te se potom pojedinačni presjek izrezuje i pohranjuje na računalu. Svaki tako izrezani i izolirani presjek se ponovno otvara u programu Microsoft Office Picture Manager da bi se namjestio kontrast i svjetlina. Manipuliranje kontrastom i svjetlinom nam je omogućilo da vizualiziramo dijelove bačvastog polja koji se ne vide nakon skeniranja ili fotografiranja. Najčešće vrijednosti kontrasta su bile od -20 do +20, dok su vrijednosti svjetline bile od 0 do +30. Međutim, svaki presjek je zahtijevao individualni pristup te je bilo i odstupanja od toga raspona. Nakon uređivanja slike slijedila je selekcija slika koje će se analizirati pomoću programa ImageJ. Kriterij za selekciju je bila vidljivost bačvastih polja, odnosno pojedinačnih bačvi područja somatosenzoričkog korteksa zaduženog za primanje podražaja iz brkova štakora. Program ImageJ je besplatan program koji se može pronaći na internetu, a poslužio nam je ocrtavanju pojedinih bačvi u preparatima i dobivanja podataka o njihovoj geometriji. Prethodno smo pomoću milimetarskog papira umetnutog na jedan preparat ustanovili da 186.7 piksela čini 1 mm te smo tu vrijednost primijenili na sve analizirane preparate. Pri analizi, koristili smo iduće geometrijske veličine: površinu, opseg i Feretov promjer (udaljenost između dvije paralelne tangente položene na ocrtanu bačvu koja nam daje informaciju o veličini bačve). Svaku smo bačvu ocrnali, označili brojem i dobili njene geometrijske podatke koje smo pohranili u tabličnom obliku u Microsoft Excel-u. Od svih prereza mozga životinje iz svake od triju tretiranih skupina odabrali smo po jedan reprezentativni (analogni) prerez za statističku analizu.

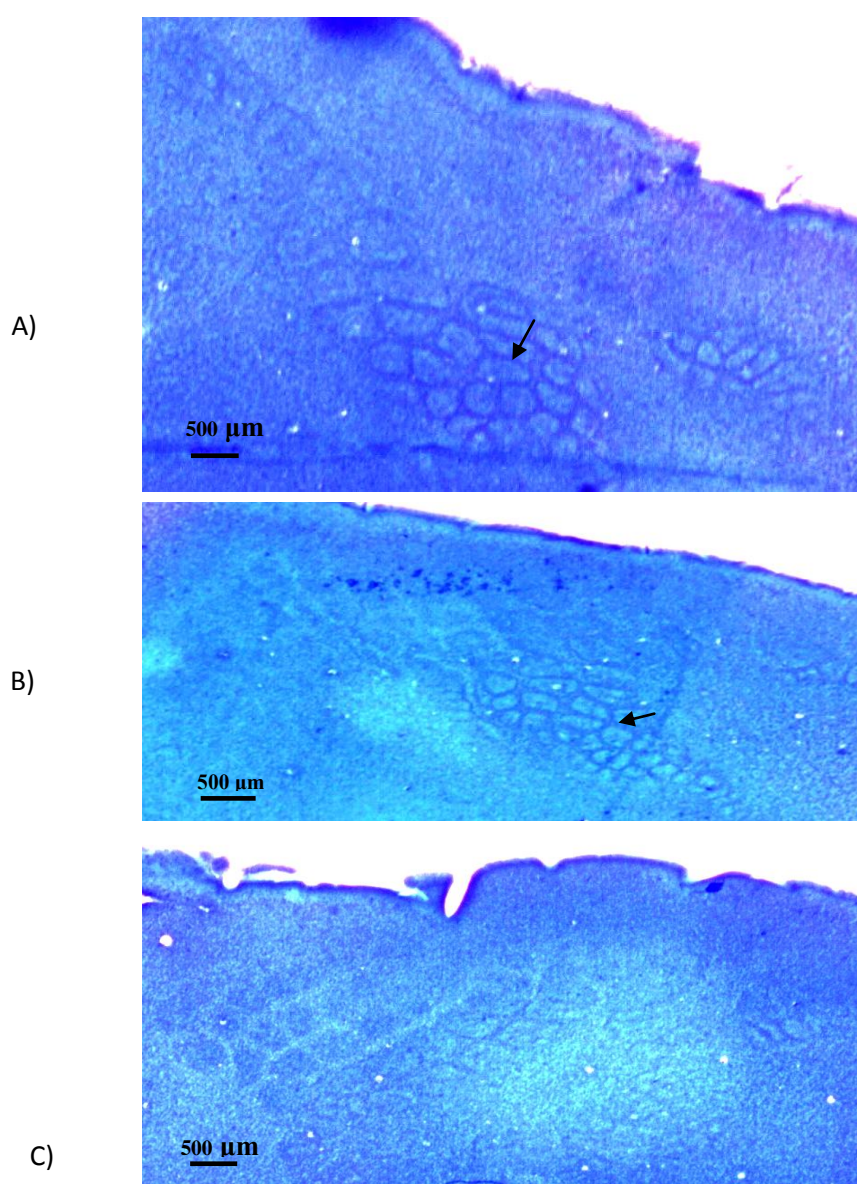
### 3.2.4. STATISTIČKA ANALIZA

Pri statističkoj obradi podataka koristili smo program GraphPadPrism 5. Za određivanje pravilnosti distribucije koristili smo Kolmogorov-Smirnov test. Pravilno distribuirane parametre usporedili smo jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s naknadnim Dunnettovim testom. Parametri koji nisu imali pravilnu distribuciju analizirali smo neparametrijskom Kruskal-Wallis analizom s naknadnim Dunnovim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (engl. *mean*, M)  $\pm$  standardna devijacija (engl. *standard deviation*, SD). Značajnost rezultata je prihvaćena kod  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. ANALIZA HISTOLOŠKIH PREPARATA

Slika 5 prikazuje tipičan presjek mozga u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom, 5HTP-om i TCP-om. Bačve u mozgu iz kontrolne skupine imaju jasno definirani obrub kojeg čine granularne stanice. Organizacija bačvi u bačvastom polju je očuvana te možemo jasno odrediti red (A-E) i stupac (broj) bačve zadužene za primanje podražaja iz odgovarajućeg brka. Skupina tretirana 5HTP-om nema značajno narušenu organizaciju bačvi u usporedbi s kontrolnom skupinom. Skupina tretirana TCP-om ima vidljivo narušenu organizaciju bačvi u bačvastom polju. Bačve su difuzne sa slabo definiranim obrubom.



**Slika 5.** Tipičan prerez mozga štakora tretiranog A) fiziološkom otopinom, B) 5-HTP-om i C) TCP-om, pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 2x) nakon bojanja po Nisslu. Strelice označavaju obrub bačve, koji u prerezu C) nije jasno definiran.

## 4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA BAČVI U BAČVASTOM POLJU

Vidljivu kvalitativnu razliku u organizaciji bačvastih polja pokušali smo kvantificirati analizom površine, opsega i Feretovog promjera bačvi.

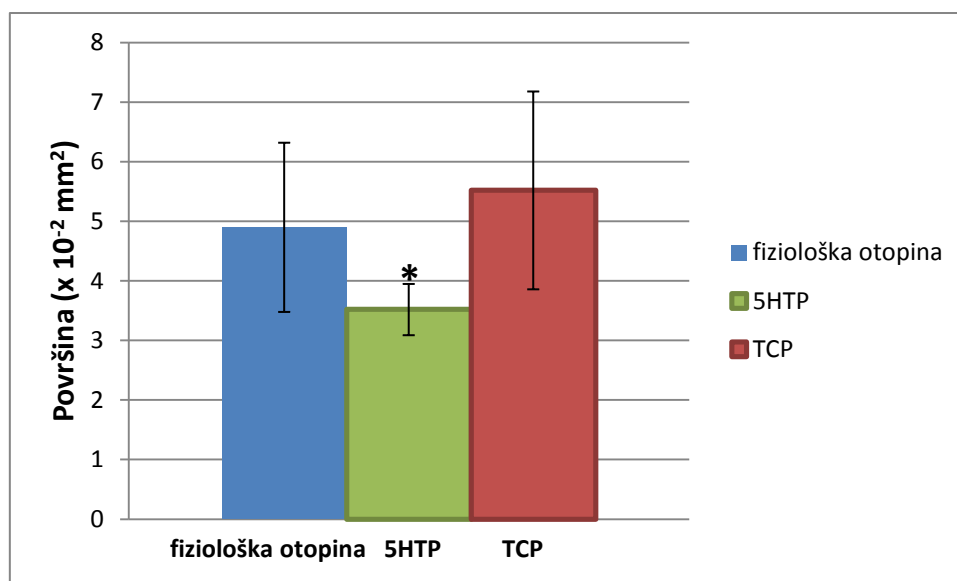
### 4.2.1. POVRŠINA

Tablica 2 prikazuje prosječnu površinu bačvi u pojedinim redovima bačvastog polja u dijelu somatosenzoričkog korteksa koji prima podražaje iz brkova štakora. S obzirom da su bačve iz reda A imale značajno manje vrijednosti površine od bačvi iz ostalih redova (B-D), one su isključene iz usporedbe prosječnih vrijednosti površine.

**Tablica 2.** Prosječna površina bačvi ( $\times 10^{-2} \text{ mm}^2$ ) i broj bačvi (u zagradi) u pojedinim redovima bačvastog polja u prerezima somatosenzoričkog korteksa tretiranih životinja

skupina	redak u bačvastom polju			
	A	B	C	D
fiziološka otopina	$3.17 \pm 0.05$ (3)	$4.54 \pm 1.00$ (5)	$5.10 \pm 1.64$ (5)	$5.12 \pm 1.85$ (4)
5HTP	$3.62 \pm 0.91$ (4)	$3.90 \pm 0.42$ (2)	$3.40 \pm 0.14$ (2)	$3.25 \pm 0.49$ (2)
TCP	$3.93 \pm 2.20$ (3)	$3.98 \pm 0.42$ (4)	$5.25 \pm 0.42$ (4)	$6.98 \pm 1.69$ (5)

Utjecaj tretmana na površinu bačvi je bio značajan ( $P = 0.0152$ ,  $KW = 8.377$ ), pri čemu su štakori tretirani TCP-om imali nešto veću prosječnu površinu ( $5.52 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \pm 1.66 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ ) od kontrolnih ( $4.90 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \pm 1.42 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ ), a štakori tretirani 5HTP-om značajno manju ( $3.52 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \pm 0.43 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ ) (Slika 6).



**Slika 6.** Prosječna površina bačvi u bačvastom polju štakora tretiranog fiziološkom otopinom (FO), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallisovog testa.

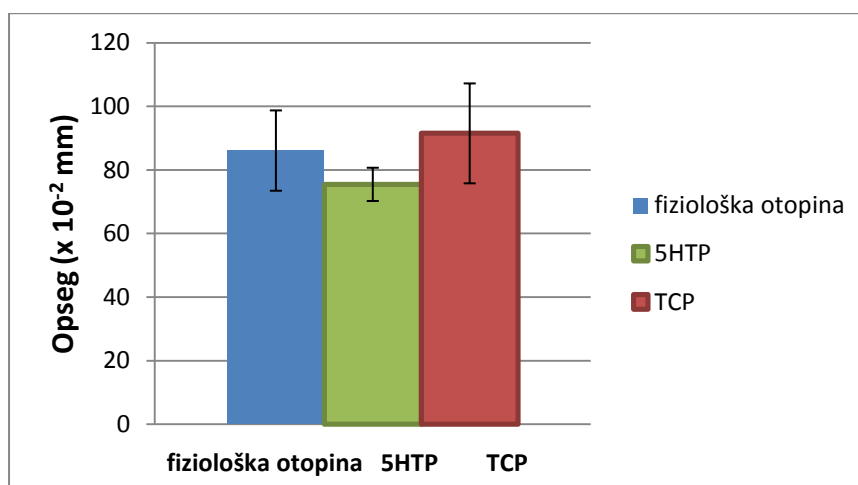
#### 4.2.2. OPSEG

Tablica 3 prikazuje prosječan opseg bačvi u pojedinim redovima bačvastog polja u dijelu somatosenzoričkog korteksa koji prima podražaje iz brkova štakora. S obzirom da su bačve iz reda A imale značajno manje vrijednosti opsega od bačvi iz ostalih redova (B-D), one su isključene iz usporedbe prosječnih vrijednosti opsega.

**Tablica 3.** Prosječan opseg bačvi ( $\times 10^{-2}$  mm) i broj bačvi (u zagradi) u pojedinim redovima bačvastog polja u prerezima somatosenzoričkog korteksa tretiranih životinja

skupina	redak u bačvastom polju			
	A	B	C	D
fiziološka otopina	$66.27 \pm 0.68$ (3)	$85.00 \pm 9.27$ (5)	$86.50 \pm 14.0$ (5)	$87.00 \pm 17.58$ (4)
5HTP	$73.25 \pm 9.71$ (4)	$81.00 \pm 3.25$ (2)	$70.85 \pm 2.75$ (2)	$74.60 \pm 3.68$ (2)
TCP	$55.70 \pm 28.50$ (3)	$74.70 \pm 4.18$ (4)	$89.55 \pm 7.00$ (4)	$106.6 \pm 10.10$ (5)

Utjecaj tretmana na opseg bačvi je pokazao indikativnu razliku ( $P = 0.0612$ ,  $KW = 5.586$ ), pri čemu su štakori tretirani TCP-om imali nešto veći prosječan opseg ( $91.52 \times 10^{-2} \text{ mm} \pm 15.71 \times 10^{-2} \text{ mm}$ ) od kontrolnih ( $86.11 \times 10^{-2} \text{ mm} \pm 12.63 \times 10^{-2} \text{ mm}$ ), a štakori tretirani 5HTP-om nešto manji ( $75.48 \times 10^{-2} \text{ mm} \pm 5.23 \times 10^{-2} \text{ mm}$ ), no razlika nije bila značajna (Slika 7).



**Slika 7.** Prosječan opseg bačvi u bačvastom polju štakora tretiranog fiziološkom otopinom (FO), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

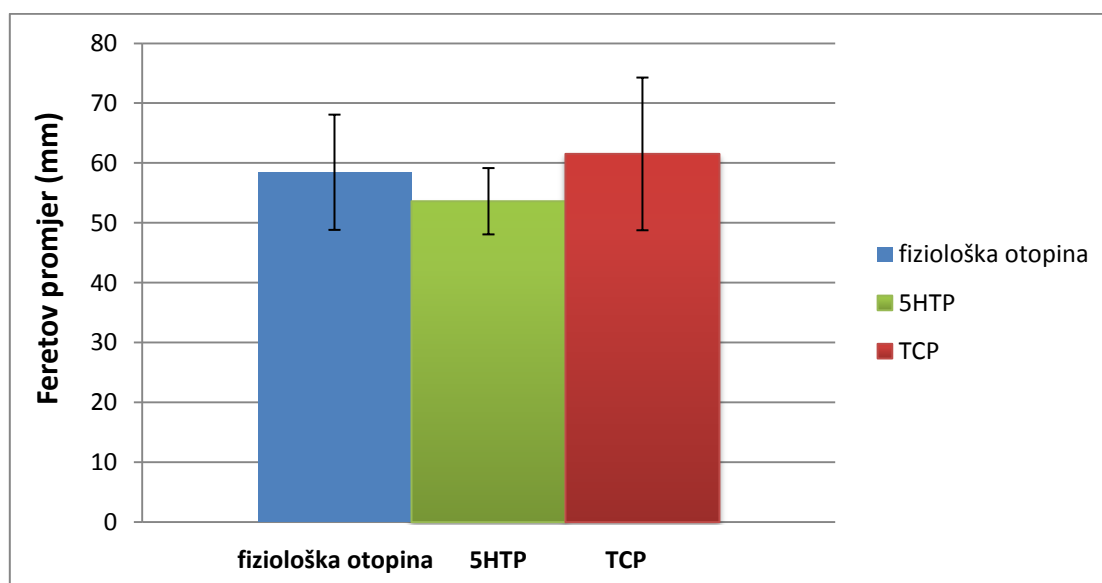
#### 4.2.3. FERETOV PROMJER

Tablica 4 prikazuje prosječan Feretov promjer u pojedinim redovima bačvastog polja u dijelu somatosenzoričkog korteksa koji prima podražaje iz brkova štakora. S obzirom da su bačve iz reda A imale značajno manje vrijednosti Feretovog promjera od bačvi iz ostalih redova (B-D), one su isključene iz usporedbe prosječnih vrijednosti Feretovog promjera.

**Tablica 4.** Prosječan Feretov promjer bačvi (mm) i broj bačvi (u zagradi) u pojedinim redovima bačvastog polja u prerezima somatosenzoričkog korteksa tretiranih životinja

skupina	redak u bačvastom polju			
	A	B	C	D
fiziološka otopina	43.16 ± 1.23 (3)	58.56 ± 9.40 (5)	57.58 ± 9.41 (5)	59.47 ± 12.92 (4)
5HTP	51.37 ± 6.78 (4)	58.69 ± 6.05 (2)	49.05 ± 4.87 (2)	53.15 ± 0.93 (2)
TCP	60.74 ± 0.61 (3)	48.35 ± 3.38 (4)	59.40 ± 6.78 (4)	73.80 ± 8.90 (5)

Utjecaj tretmana na Feretov promjer nije pokazao značajnu razliku ( $P = 0.3236$ ,  $F = 1.172$ ), iako su štakori tretirani TCP-om opet imali nešto veći prosječan Feretov promjer ( $61.55\text{mm} \pm 12.76\text{mm}$ ) od kontrolnih ( $58.47\text{mm} \pm 9.67\text{mm}$ ), a štakori tretirani 5HTP-om nešto manji ( $53.63\text{mm} \pm 5.56\text{mm}$ ) (Slika 8).



**Slika 8.** Prosječan Feretov promjer bačvi u bačvastom polju štakora tretiranog fiziološkom otopinom (FO), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.



## **5. RASPRAVA**

Bačve su jednostavan i istraživački pristupačan model za proučavanje kortikalnog razvoja i funkcije. Međutim, još uvijek nije poznat točan mehanizam formiranja bačvi niti njihova specifična funkcija. Također, nije uočen funkcionalni nedostatak njihove odsutnosti u živom glodavcu. No ipak, citoarhitektura bačvastih polja može poslužiti kao indikator pravilnog razvoja kore mozga i odstupanja od istog. Budući da je za pravilan razvoj bačvi nužna komunikacija između talamokortikalnih aferentnih aksona (TCA) i neurona kore u razvoju, moguće je manipulacijama u aferentnom putu narušiti veličinu i organizaciju bačvastih polja.

Rezultati jedne skupine istraživanja impliciraju esencijalnu ulogu periferne neuralne aktivnosti na razvoj i formiranje strukturalnog obrasca bačvi. Intaktni brkovi su nužni za pravilno formiranje bačvi, stoga manipulacija brkovima može poslužiti za proučavanje formiranja bačvi. Rezanje infraorbitalne grane trigeminalnog živca koji je, između ostaloga, uključen u aferentni put od brkova do kore, značajno je poremetilo formiranje bačvi i rezultiralo je smanjenim grananjem TCA. Teška ozljeda ili uklanjanje pojedinačnog brka rezultira nedostatkom analogne bačve u somatosenzoričkoj kori. Nadalje, glodavac s embrionalno transplantiranim dodatnim brkom, imat će i dodatne bačve koje reprezentiraju taj brk u somatosenzoričkoj kori (Li i Crair, 2011). Druga skupina istraživanja dobila je kontradiktorne rezultate koji impliciraju da uloga periferne neuralne aktivnosti nije esencijalna u formiranju bačvi. Pritom su farmakološkim manipulacijama pokušali blokirati neurotransmisiju na razini širenja akcijskog potencijala ili na razini vezanja neurotransmitera na receptor. Pri korištenju antagonista natrijevih naponom reguliranih kanala koji blokiraju propagaciju akcijskog potencijala, uobičajeno formiranje bačvi u moždanom deblu, talamusu i somatosenzoričkoj kori je zadržano. Korištenje antagonista glutamatskih (NMDA) receptora također nije pokazalo utjecaj na formiranje bačvi. Navedene farmakološke manipulacije upućuju da formiranje bačvi ne ovisi o neuralnoj aktivnosti, no ne mogu objasniti značajan utjecaj ozljeda u perifernom živcu ili embrionalne transplantate brka na razvoj bačvi (Li i Crair, 2011). Istraživanja bazirana na molekularno-genetičkim manipulacijama su pridonijela dubljem razumijevanju formiranja bačvi. Divlji tip miša posjeduje aferentne nakupine TCA u centru bačve dok neuroni sloja IV okružuju TCA nakupine čineći obrub bačve. Kod jedne skupine mutanata poput *CxNR1 knockout* miševa, kojima nedostaje funkcionalni NMDA receptor u kortikalnim ekscitacijskim neuronima, formiranje nakupina TCA u centru bačvi je intaktno, ali obrub sloja IV je odsutan. U drugoj skupini mutanata poput *AC1 knockout* miševa, kojima nedostaje enzim adenilat ciklaza 1, nakupina TCA i obrub sloja IV su u potpunosti odsutni (Li i Crair, 2011).

Rezultati dosadašnjih istraživanja implicirali su i važnu ulogu serotoninske neurotransmisije u regulaciji razvoja bačvastih polja te su pokazala da višak serotonina u sinaptičkoj pukotini narušava strukturu bačvastih polja, vjerojatno djelujući preko 5HT1B receptora na okončinama TCA. U mutantima za 5HT transporter dolazi do formiranja bačvastih polja, međutim, ona su značajno deformirana. Obrub bačvi je slabo definiran i teško uočljiv, šupljine su znatno šire, a površina bačvi je manja. Kombinacija manjih bačvi i širih šupljina rezultiraju bačvastim poljem koji se veličinom ne razlikuje od bačvastog polja divljeg tipa (Miceli, 2013). Izbacivanje ili inaktivacija gena za 5HT1B receptor, u jednostrukim ili dvostrukim mutantima za 5HT transporter i/ili MAO, dovodi do uobičajenog formiranja bačvi. Također, pokazalo se da visoka razina 5HT u sinaptičkoj pukotini, djelujući preko 5HT1B receptora, uzrokuje stvaranje neuobičajenog obrasca bačvastih polja u mutiranim miševima. Navedeni rezultati impliciraju da aktivacija 5HT1B receptora ima ključnu ulogu u ometanju formiranja bačvi u mutantima (Young-Davies i sur., 2000). Povećanje razine 5HT korištenjem inhibitora enzima MAO u *knockout* štakorima ili miševima za MAO dovodi do povećanja veličine bačvastih polja između postnatalnog dana 0 i postnatalnog dana 4, dok smanjenje razine 5HT dovodi do smanjenja bačvastih polja (Whitaker-Azmitia, 2001).

### 5.1. UČINAK 5HTP-a

5-hidroksitriptofan (5HTP) je produkt reakcije katalizirane triptofan hidroksilazom (TPH) te ujedno i neposredni prekursor serotonina. Prilikom dizajna eksperimenta, 5HTP je specifično odabran za indukciju hiperserotoninemije, a ne Trp ili 5HT. Jedan od razloga je prisutnost 5HTP isključivo u serotoninskom biosintetskom putu te njegovo direktno kvantitativno prevođenje u 5HT (Birdsall, 1998; Magnussen i Nielsen-Kudsk, 1980; Udenfriend i sur., 1957). Nadalje, korištenjem 5HTP zaobilazi se ograničavajući korak u biosintezi serotonina kataliziran enzimom TPH te 5HTP prelazi krvno-moždanu barijeru i placentarnu barijeru bez specifičnog transportera (Birdsall, 1998). Pokazano je da tretman 5HTP-om efikasno podiže koncentraciju serotonina na periferiji, no ne i u mozgu. Dugoročni efekt tretmana 5HTP-om je uspostavljena serotoninska homeostaza na periferiji, dok je u mozgu blago, ali značajno snižena koncentracija serotonina, vjerojatno uzrokovana manjim brojem okončina 5HT neurona, bez promjena u metabolizmu 5HT (Hranilović i sur., 2011). Štakori tretirani 5HTP-om imali su dobro definirane bačve, no njihova površina je bila manja što fenotipski nalikuje *knockout* mutantima za 5HT transporter (Miceli, 2013).

Budući da 5HT negativno regulira grananje aksona (Whitaker-Azmitia, 2005); moguće je da je višak 5HT iz krvi uzrokovao manji broj okončina 5HT neurona (na što ukazuje i podatak o smanjenoj razini 5HT bez utjecaja na metabolizam) i zato je površina bačvi manja. TCA ima manje, ali oni oslobađaju normalne količine 5HT, stoga je organizacija neurona sloja IV kore, koji obrubljuju bačve, zadržana.

## 5.2. UČINAK TCP-a

Tranilcipromin (TCP) je ireverzibilni neselektivni inhibitor MAO, glavnog enzima zaduženog za razgradnju serotonina i drugih monoamina. MAO postoji u dvije jednako zastupljene izoforme u mozgu: MAO-A i MAO-B (Lang i sur., 2004). Prilikom dizajna eksperimenta, TCP je specifično odabran jer efikasno inhibira obje izoforme enzima a čime dovodi do efikasnog povišenja razine 5HT. Inhibicijom obje izoforme izbjegava se kompenzatorni učinak do kojega bi došlo da je jedna izoforma aktivna, a druga inhibirana (Weinstock i sur., 2003). Tretman TCP-om rezultirao je povišenom koncentracijom 5HT i na periferiji i u mozgu (Ferrer i Artigas, 1994; Hranilović i sur., 2011). Dugoročni efekt tretmana TCP-om je hiperserotoninemija na periferiji, dok je u mozgu kompenzatorno pojačana razgradnja 5HT koja, nakon prestanka tretmana, rezultira sniženim koncentracijama 5HT u moždanom deblu i kori (Hranilović i sur., 2011). Tretman TCP-om nije utjecao na veličinu bačvi nego na njihovu definiranost. Izmjereno blago povećanje površine i opsega može biti rezultat težeg definiranja polja pri mjerenju. Moguće je da je uslijed endogenog povećanja koncentracije 5HT (uključujući i TCA neurone) došlo do narušavanja pravilnog razvoja kore, a posljedično i strukture bačvastih polja.

## **6. ZAKLJUČCI**

- 1) Izloženost mozga povišenim koncentracijama serotonina tijekom razvoja narušila je obrazac formiranja i citoarhitekturu bačvastih polja u somatosenzoričkom korteksu štakora.
- 2) Posljedice primjene prekursora serotonina, 5HTP-a, koji narušava homeostazu 5HT samo u perifernom odjeljku, bile su znatno manje od posljedica primjene inhibitora razgradnje serotonina, TCP-a, koji narušava homeostazu 5HT i u perifernom i u središnjem odjeljku.
- 3) Pretpostavljamo da je povećanje periferne koncentracije 5HT, izazvano 5HTP-om, negativno utjecalo na grananje aksona serotonergičkih neurona, što se odrazilo na veličinu bačvi u bačvastom polju.
- 4) Pretpostavljamo da je porast koncentracije 5HT u serotonergičkim neuronima, izazvan primjenom TCP-a, narušio organizaciju kortikalnih neurona, a time i strukturu bačvastih polja.

## **7. LITERATURA**

Berger M, Gray JA, Roth BL (2009): The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* **60**: 355 – 366.

Billett E (2004): Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *NeuroToxicology* **25**: 139 – 148.

Birdsall TC (1998): 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review* **3**: 271 – 280.

Blažević S, Jurčić Ž, Hranilović D (2010): Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranylcypromine. *Translational Neuroscience* **1**: 49 – 54.

Blažević S, Dolenec P, Hranilović D (2011): Physiological consequences of perinatal treatment of rats with 5-hydroxytryptophan. *Periodicum Biologorum* **113**: 81 – 86.

Blažević S, Hranilović D (2013): Expression of 5HT-related genes after perinatal treatment with 5HT agonists. *Translational Neuroscience* **4** (2): 165 - 171.

Chugani DC, Muzik O, Rothermel R, Behen M, Chakraborty P, Mangner T, da Silva EA, Chugani HT (1997): Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys. *Annals of Neurology* **42**: 666 – 669.

Davies K, Richardson G, Akmentin W, Acuff V, Fenstermacher J (1996): The microarchitecture of cerebral vessels. In: Courad, P., Scherman, D. (Eds.), *The Cerebral Vascular Symposium, Biology and Physiology of the Blood–Brain Barrier*. Plenum Press, New York.

Ferrer, A., Artigas, F. (1994): Effects of single and chronic treatment with tranylcypromine on extracellular serotonin in rat brain. *European Journal of Pharmacology* **263**: 227 – 234.

Hranilović D, Blažević S, Ivica N, Čičin-Šain L, Orešković D (2011): The effects of perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranylcypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International* **59**: 202 – 207.



Janusonis S (2005): Serotonergic paradoxes of autism replicated in a simple mathematical model. *Medical Hypotheses* **64**: 742 – 750.

Lang W, Masucci JA, Caldwell GW, Hageman W, Hall J, Jones WJ, i sur. (2004): Liquid chromatographic and tandem mass spectrometric assay for evaluation of in vivo inhibition of rat brain monoamine oxidases (MAO) A and B following a single dose of MAO inhibitors: application of biomarkers in drug discovery. *Analytical Biochemistry* **333**: 79 - 87.

Li H, Crair MC (2011): How do barrels form in somatosensory cortex? *Annual New York Academic Science* **1225**: 119 - 29

Lucki I (1998): The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Society of Biological Psychiatry* **44**: 151 – 162.

Magnussen I, Nielsen-Kudsk F (1980): Bioavailability and related pharmacokinetics in man of orally administered L-5-hydroxytryptophan in steady state. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **46**: 257 – 262.

McBride W J, Lovinger DM, Machu T, Thielen RJ, Rodd ZA, Murphy JM, Roache JD, Johnson BA (2004): Serotonin-3 Receptors in the Actions of Alcohol, Alcohol Reinforcement, and Alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **28**: 257 – 267.

McNamara IM, Borella AW, Bialowas LA, Whitaker-Azmitia PM (2008): Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. *Brain Reasearch* **1189**: 203 - 214.

Miceli S (2013): High serotonin levels during brain development alter the structural input-output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV. *Cell Neuroscience* **7**: 88.

Murphy D, Andrews A, Wichems C (1998): Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* **59**; 4 – 12.

Racke K, Reimann A, Schwörer H, Kilbinger H (1996): Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural brain research* **73**; 83 – 87.

Shemer AV, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM (1991): Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Developmental Brain Research* **59**: 59 – 65.

Stolz JF (1985): Uptake and storage of serotonin by platelets. U: Vanhoutte, PM (ur.) Serotonin and the cardiovascular system. New York Raven Press, str. 38 – 42.

Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L, i sur. (2005): Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *American Journal of Human Genetics* **77**: 265 - 279.

Udenfriend S, Weissbach H, Bogdanski D (1957): Increase in tissue serotonin following administration of its precursor 5-hydroxytryptophan. *Journal of Biological Chemistry* **224**: 803 – 810.

Van Praag HM (1983.): CSF 5-HIAA and suicide in non-depressed schizophrenics. *Lancet* **2**: 977.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003): Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**, 76.

Weinstock M, Gorodetsky E, Poltyrev T, Gross A, Sagi Y, Youdim MBH (2003): A novel cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitor for the treatment of dementia comorbid with depression and Parkinson's disease. *Progress in NeuroPsychoPharmacology and Biological Psychiatry* **27**: 555- 561.

Whitaker-Azmitia PM (2001): Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin* **56**: 479 – 485.

Whitaker-Azmitia PM (2005.): Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *International Journal of Developmental Neuroscience* **23**: 75 – 83.

Young-Davies, CL, Bennett-Clarke CA, Lane RD, Rhoades RW (2000): Selective facilitation of the serotonin<sub>1B</sub> receptor causes disorganization of thalamic afferents and barrels in somatosensory cortex of rat. *Journal of Comparative Neurology* **425**: 130 - 138.

<http://www.completehealthdallas.com/Anti-DepressantsNaturalAlternativeDallas.html>

[http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab\\_wiki/\\_/farmakologi/serotonin-i-ergot-alkaloidi-r280](http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/_/farmakologi/serotonin-i-ergot-alkaloidi-r280)